

—基礎科学から医学・医療を見る—

理論生物物理と生化学を組み合わせた薬効研究 キサンチン酸化還元酵素と阻害剤フェブキシostatの結合機序

藤崎 弘士^{1,2} 古田 忠臣³ 岡本 研⁴ 菊地 浩人¹

¹日本医科大学基礎科学物理学

²理化学研究所次世代計算科学研究開発プログラム分子スケール研究開発チーム

³東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻

⁴日本医科大学生化学・分子生物学

Combined Biophysical and Biochemical Study of Enzyme Effects:
Binding Mechanism of an Inhibitor Febuxostat with Xanthine Oxidoreductase

Hiroshi Fujisaki^{1,2}, Tadaomi Furuta³, Ken Okamoto⁴ and Hiroto Kikuchi¹

¹Department of Physics, Nippon Medical School

²Computational Science Research Program, RIKEN

³Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

⁴Department of Biochemistry, Nippon Medical School

Abstract

We review our recent collaborative study, performed by computational physicists and biochemists, of the enzyme effects due to the drug called febuxostat. Febuxostat, which was recently approved in the US, European Union and Japan for treatment of gout, inhibits xanthine oxidoreductase (XOR)-mediated generation of uric acid during purine catabolism. Experiments have shown that febuxostat has strong effects on mammalian XOR but not on bacterial XOR, although the two enzymes have similar three-dimensional structures. To clarify the difference in the inhibitory power of febuxostat, we performed docking and molecular dynamics simulations for mammalian and bacterial XORs. We found that the static structures are not sufficient to explain the binding difference and that important interactions occur between febuxostat and the active region of the enzymes which suggests a better strategy for drug design.

(日本医科大学医学会雑誌 2012; 8: 222-227)

Key words: xanthine oxidoreductase, inhibitor, molecular dynamics, docking, binding free energy

1. 理論生物物理とは何か

物理学には二つの方向性がある。一つは物事の究極

の姿を明らかにするというものであり、例えば、宇宙とはどういうものなのか、ものを小さくしていったらどうなるのか、時間や空間とは何なのか、時間はどうして過去から未来にしか流れないのか、といった非常

Correspondence to Hiroshi Fujisaki, Department of Physics, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: fujisaki@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

に基本的な問いに答えようとするものである。これは基礎物理学と呼ばれ、基本的で「単純な」数式で表される法則を求めることが目標である。

一方、基礎物理学で求められた法則を使って、自然界の様々な現象を説明・予測するという方向性もあり、これは応用物理学と呼ばれる。応用物理の研究は、半導体や超伝導体に始まって、それらを含む電子機器（携帯電話や医療機器を含む）、電化製品、コンピュータ、車、飛行機、ロケット、人工衛星などといった、われわれの生活を支える様々なテクノロジーを生み出した。

この応用物理の産物であるコンピュータは、現在は非常に安価かつ高速になってきており、これを使って複雑な現象を物理的に細かく調べるというアプローチが可能となった。これは計算物理と呼ばれる分野を生み出し、様々な応用分野を作り出している。コンピュータを用いると、生体分子の原子・分子レベルのモデルを作ることも可能である。生命現象も細かく分けていけば、タンパク質やDNAなどの巨大分子の運動にほかならない¹ので、これを物理的に理解できる道が開かれたということである。このようにコンピュータなどを援用しながら、生命現象にアプローチしていく物理の分野は理論生物物理と呼ばれる。もちろん、理論に対応する実験生物物理もあり、生命現象を理解するにはそのアプローチも欠かせない。

また、最近は細胞レベルや臓器レベルの生命現象をモデリングする研究も盛んであり、神戸にできた世界最速（2012年現在）の京コンピュータをフルに活用することで、これらの研究の質が飛躍的に向上し、生体現象の分子レベルから個体レベルまでの理解が可能になるものと期待されている²。

ここではわれわれが最近発表した、酵素（キサンチン酸化還元酵素）と薬（痛風薬フェブキソスタット）の相互作用に関する分子レベルでの解析³について簡潔に紹介する。この研究は理論生物物理学者（藤崎，古田，菊地）と生化学者（岡本，Leimkühler，西野）の共同研究の結果であり、理論（計算）と実験を組み合わせることで、医学も含めた学際的な分野において、新しい結果が出た好例となっている。このような理論と実験の共同作業は今後も重要になっていくものと思われる。なお、本稿では主に理論計算の側面に関して解説するが、実験的な側面やフェブキソスタット以外の阻害剤の役割などに関しては、解説⁴を参照してほしい。

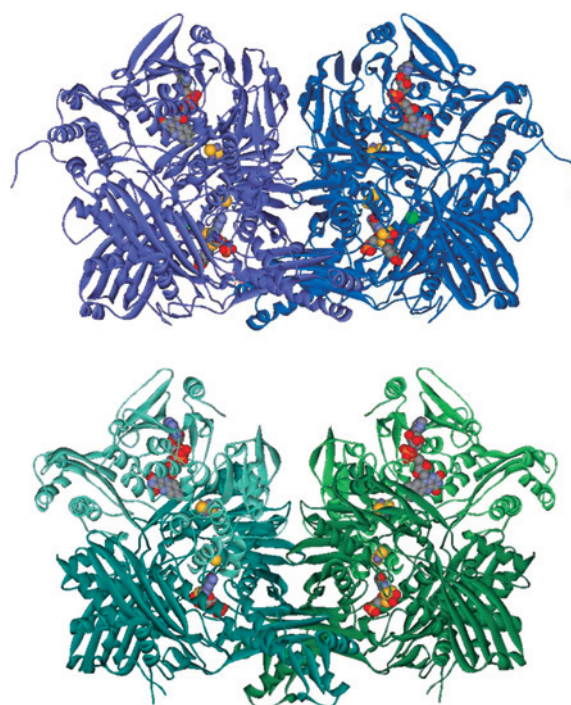


Fig. 1 Molecular structures of mammalian XOR (PDB code: 1FO4, up) and bacterial XOR (PDB code: 1JRO, down).

2. キサンチン酸化還元酵素の生体内での機能と阻害剤

複合金属酵素（鉄とモリブデンを含む）であるキサンチン酸化還元酵素（xanthine oxidoreductase = XOR）は2量体からなる分子量30万の巨大タンパク質である（Fig. 1）。近年、X線結晶構造解析によって、1.6Å分解能で、その立体構造がわかっている⁵。この酵素は、核酸（DNA，RNA）が分解されてできるキサンチン（Fig. 2a）を代謝して尿酸に変換する機能を持つ。この機能が働きすぎると、過剰に尿酸が生成され、痛風の原因となる。そこで、キサンチンの代わりにXORと結合するものを阻害剤として用い、痛風を予防するという薬学的な戦略が取られてきている。キサンチンと似た構造をもつアロプリノール（Fig. 2b）は化学的にデザインされた代表的な阻害剤であり、40年以上もの間、抗痛風薬として実際によく用いられている。（日本ではザイロリックなどの商品名で使用されている。）

従来、こういった阻害剤の開発には、ヒトやほかの哺乳類の酵素の構造情報を用いるが、それらの結晶構造解析が困難な場合、活性中心付近の立体構造がよく似ている細菌由来の酵素が用いられることが多い（哺乳類と細菌由来のXORに対する、アミノ酸相同性は

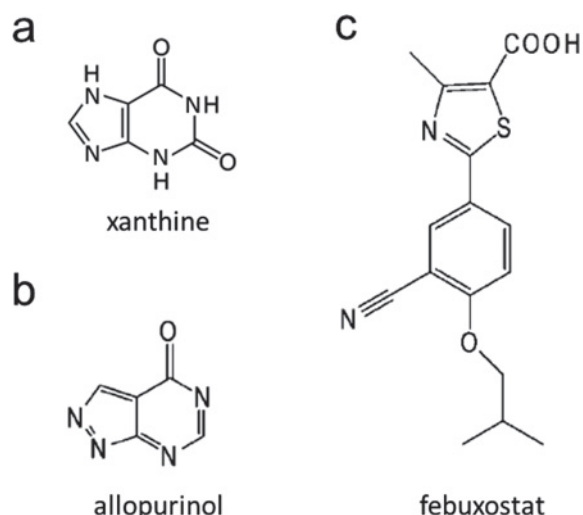


Fig. 2 Natural substrate and inhibitors for XOR. (a) Xanthine substrate. (b) Allopurinol for the treatment of gout. (c) Febuxostat, newly approved drug for gout.

61%である⁶⁾。ただ、それにもかかわらず、ある種の阻害剤に対しては、生物種が異なるとその結合の強さが異なることが分かった。

帝人ファーマが開発した TEI-6720 (Fig. 2c) という阻害剤 (2011 年から日本でも認可され、フェブリクの商品名で売られている痛風の新薬である) は、哺乳類由来の XOR (以下、bXOR と呼ぶ) に対して非常に強く (阻害定数 $K_i = 10^{-10}$ M) 結合し、結合部位の隙間を埋めるようにしてコンタクトすることが X 線結晶解析から示された⁷⁾。一方、細菌由来の XOR (以下、RcXOR と呼ぶ) に対しては、その阻害能力は非常に小さい (阻害定数 $K_i = 10^{-5}$ M)。このことは、痛風治療薬を開発する際、細菌由来の XOR を薬品開発の実験材料とすることが、無意味になることを示唆している。すなわち、分子標的薬のような薬品の開発実験をする際には、生物種を選ぶ必要があることを示唆している。

実際、bXOR と RcXOR では、本来の基質と結合する活性部位のアミノ酸残基は保存されているが、詳細に薬と酵素の結合部位を調べると、活性部位ではない結合部位の残基の一部に違いがあり、これらが薬効の違いを生み出しているものと考えられる。よって、これらの分子的な詳細を調べることが必要である。実験的には、重要そうな残基をミューテーション (異なる残基に変える) して調べることができるが、それはコストや時間がかかる上、酵素の 3 次元構造が変化してしまう恐れもある。上にも述べたように現在、生体分子内の分子的な相互作用は物理的によくモデル化でき

るようになってきているので、計算機上で薬と酵素の間の相互作用を調べることにした。

3. 計算機シミュレーションによる阻害剤の効能へのアプローチ

二種類の XOR に対するフェブキソスタットの薬効の違いを理論的に解明するために、bXOR (PDB コード: 1FO4) と RcXOR (PDB コード: 1JRO) をターゲットにして、ドッキング・シミュレーションと分子動力学 (molecular dynamics = MD) シミュレーションを行った。

ドッキング・シミュレーションとは、タンパク質の構造と、薬 (リガンド) の化学組成が与えられたときに、リガンドがどのようにタンパク質に結合するかということを経験的な相互作用関数を使ってサーチするものであり、大量の薬の候補を絞り込む (スクリーニングする) ときにとられる実際的なアプローチである。その計算時間は非常に短く、コストがかからないが、その替わり精度は悪い。一方、分子動力学 (MD) はタンパク質やリガンドを原子レベルでモデル化し、その間の相互作用を物理的に取り入れて、ニュートン方程式を解く手法であり、ドッキングと比べると非常にコストはかかるが、その分詳細な情報が得られる。

リガンドと XOR の相互作用を調べるのが主たる目的なので、PDB 座標からリガンド結合部位を含む、800 残基ほどのモリブドプテリン・ドメインを切り出した (Fig. 3a)。ただし、1JRO に関しては、X 線構造解析で得られなかった 20 ほどの欠損残基があるが、その部分はキャップした (切断部分に中性になるようにアセチル基とアミン基を付加した)。後で分かるように、RcXOR のほうの揺らぎが大きいという結論なので、この欠損残基を入れて揺らぎが抑えられるとは思われない。

3.1. ドッキング・シミュレーション

ドッキングの計算には、Discovery Studio 2.5 (Accelrys Inc.) というソフトウェアに組み込まれている LigandFit というモジュールを用いた。このモジュールにおいて結合具合を表すコスト関数は、結合自由エネルギーとよく相関していることが知られている⁸⁾。これを用いて、2 種類の XOR にフェブキソスタットをドッキングさせると、ともに bXOR の結晶構造に近い結合状態が得られた。また、その際のコスト関数の値も非常に似たものであった。しかし、この計算結果は実験事実とは異なる。これはドッキング用の経

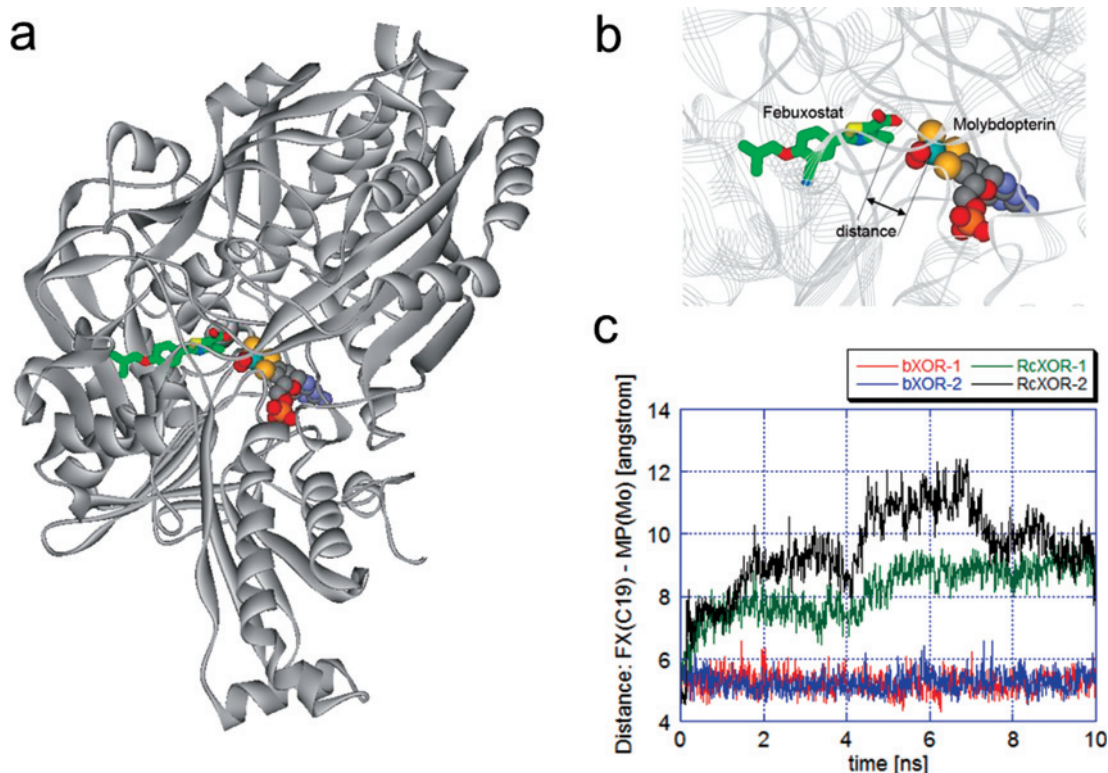


Fig. 3 (a) Molybdopterin domain for MD simulations, containing ~ 800 amino acid residues. (b) Definition of the distance between molybdopterin and febuxostat. (c) The time courses of the distance for mammalian and bacterial XORs.

験的な相互作用関数の精度が十分でない（水の効果を十分にに取り込めていない）こと、タンパク質の（特に側鎖の）揺らぎや変形を考慮していない計算であることなどがその原因として考えられる。

よって、これは単純にタンパク質の静的な構造を決めれば薬効が決まるという話ではないことが分かる。そこで、動的な効果も十分考慮できる MD シミュレーションを行った。

3.2. MD シミュレーション

MD を行うために、現在は様々な力場（原子間の相互作用を記述するもの、ポテンシャル関数とも呼ばれる）とソフトウェアが用意されており、用途に応じて取捨選択することができる。ここでは、リガンドに関する力場が作りやすい、amber 力場を用い、その力場を使って MD 計算を実行する代表的なソフトウェアである、Amber 11⁹を用いることにした。

また、このときの MD シミュレーションを難しくしている要因の一つに金属原子の存在がある。モリブドプテリン・ドメインはその名の表すようにモリブデンを含むので、その部分は量子化学計算ソフトウェア Gaussian09¹⁰を使って、部分的な電荷を決め、モリブ

デン周りのその他の力場も手作業で決定した。

安定した MD 計算のために、モリブドプテリン・ドメインの周りに溶媒水を配位させ、それを周期境界条件をもつ箱の中に入れた。その際は全体の電荷を中和させるためにイオンも入れた。その結果、二つの XOR は、それぞれ約 10 万原子ほどが含まれる系となった。この研究では、二つの XOR の結合部位に初期状態として適当な位置（後述）にフェブキシスタットを置いて、それがその後の時間発展によってどう変化するかということを調べた。bXOR の場合は、実際に結晶構造（PDB コード：1NX5）で得られる状態に近い位置（Fig. 4a）に置き、RcXOR に対しては、それと似たような位置（Fig. 4b）に置いた。

その後の時間発展の様子が Fig. 3c と Fig. 4c～f に示されている。まず、モリブデンとフェブキシスタットの距離を Fig. 3b のように測ることにすると、bXOR の場合はその距離はほぼ一定であり安定だが、RcXOR の場合は 10 ナノ秒の時間スケールで離れていく傾向にあることが分かった（Fig. 3c）。この結果から RcXOR の方が薬との相互作用が不安定であり、薬効が少ないことが予測されるが、実際、これは実験結果と一致している。

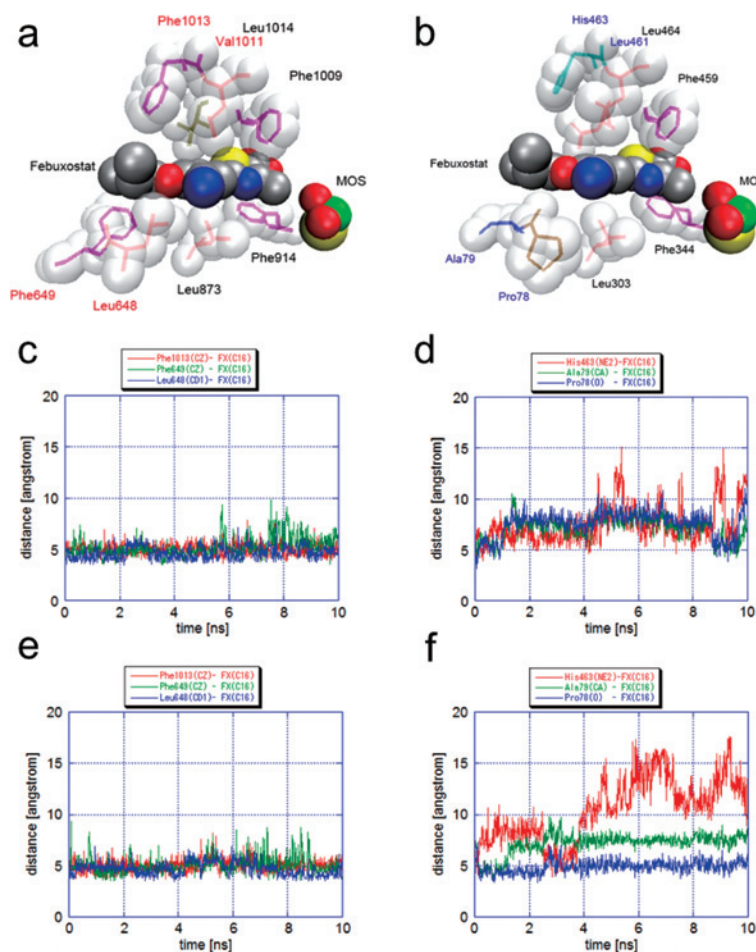


Fig. 4 Initial conditions for mammalian (a) and bacterial (b) XORs for MD simulations. The corresponding simulated results are (c, e) and (d, f) for mammalian and bacterial XORs, respectively.

また、この原因をより細かく調べるために、結合部位にある残基とフェブキシスタットの間の距離を調べてみた。すると、**Fig. 4c~f**に示されているように、フェブキシスタットの末端部分とその周りの残基は、bXORの場合はほぼ一定だが、RcXORの場合は激しく運動していることが分かった。**Fig. 2c**から分かるように、フェブキシスタットの末端部分はメチル基であり、その部分と親和性があるのは、疎水性の残基である。bXORの場合はまさにそうになっており、その間の結合は安定であることが予想されるが、RcXORの場合は親水性の残基も含み、安定性は弱い。MD計算はこの化学的な直感が正しいことを示唆している。

また、ここでは示していないが、フェブキシスタットにはニトリル基 ($-CN$) があり (**Fig. 2c**)、それがbXORの場合は周りの残基と水素結合しているが、RcXORの場合はそれが失われていることも分かった。しかし、この部分の残基を変えて、計算・実験してみても、結果はそんなに大きく変わらず、この水素

結合がどれくらい効いているのかということに関しては定量的な結果を出すに至っていない。これは今後の課題である。

このような分子的な知見を積み重ねていくことで、薬を改良していくことも可能となる。例えば、薬の末端部位を計算機上で変えることで、活性部分との相互作用がどのように変わるか、もっと系統的に調べていくことができる。もちろん、MD計算には様々な限界があるので、実験によるフィードバックは欠かせない。このように実験と理論計算が協調しながら研究を進めていくことで、薬効の物理的理解が可能となり、それがひいてはドラッグ・デザイン、ドラッグ・ディスカバリーへの有効な生物物理学的アプローチとなるかもしれない。

4. まとめと展望

本稿では、理論と実験を組み合わせた共同研究から

新たな結果が出た好例としてわれわれの最近の研究を主に理論的な側面から紹介した。

本研究では、二種類のキサンチン酸化還元酵素 (XOR) のドッキング・シミュレーションと MD シミュレーションを行い、抗痛風薬として使われているフェブキソスタットと結合部位の間の相互作用の解析を行った。その結果、哺乳類由来の XOR に関しては薬との相互作用は安定であり、細菌由来の XOR に関しては不安定であることが分かった。これは実験事実をサポートするものである。また、その相互作用を詳細に調べることで、薬の末端部分と結合部位の相互作用が重要であることが示唆され、この知見をもとにより薬を改良していくための手がかりが得られた。

しかし、本研究はまだ不十分な点も多い。薬と酵素の親和性に関して定量的にアプローチするためには、結合自由エネルギーを計算する必要がある。そのためには膨大な計算コストが必要となるが、薬の化学的な装飾を変えたとき、また酵素の残基をミューテーションしたときに結合がどうなるかということを調べるには、単純な MD 計算では不十分であり、そのような計算をしなければならない。結合自由エネルギーの計算は、従来は難しいと考えられていたが、現在は様々な新しいアルゴリズムの開発により、比較的容易になってきている¹¹。直近の課題としては是非やらなければならないテーマである。

本研究では、モリブドプテリンドメイン (**Fig. 3a**) だけを切り出して計算しているが、細胞内では **Fig. 1** にあるような複合体として存在しているので、これを丸ごと計算する必要がある。原子数が膨大となって計算コストがかかるが、より自然な状況でどうなっているか調べるためにはやらなければならない。

また、結合部位では阻害剤 (**Fig. 2b, c**) が入り込むだけでなく、天然の基質 (**Fig. 2a**) が入りこんで酵素反応を起こす。このプロセスはもちろん生化学的には重要であり、それに対しても理論計算を用いたアプローチは可能である。しかし、酵素反応は化学結合が切れたり、つながったりするプロセスなので、つながっているボンドを仮定している MD 計算で扱うのは容易ではない。そこで、化学反応を扱える量子化学計算と MD 計算を組み合わせで対処していかなければならない。これは難しい課題だが、このようなハイブリッドなシミュレーション手法は、現在、ホットなトピックスとなっている¹²。

本稿では阻害剤と酵素の相互作用について取り上げ

たが、本物理学教室ではほかにも、筋肉タンパク質分子ミオシンに関する量子化学計算¹³、免疫系におけるペプチドと MHC との相互作用の計算¹⁴、酵素の構造変化経路の計算¹⁵、生体分子内の振動エネルギー緩和に関する計算¹⁶などを行っており、物理学と生物学もしくは化学の境界に属するような問題に関した研究を推進している。

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究 (研究課題番号: 23570198 (C), 22540421 (C), 16205021 (A)) と文部科学省最先端・高性能汎用スーパーコンピュータの開発利用「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」の支援を受けている。

文 献

1. Zuckerman DM: Statistical Physics of Biomolecules: An Introduction, 2010; CRC Press, Phillips R, Kondev J, Theriot J, Physical Biology of the Cell, Garland Science, 2009.
2. http://www.nsc.riken.jp/index_j.html
3. Kikuchi H, Fujisaki H, Furuta T, Okamoto K, Leimkuhler S, Nishino T: Scientific Reports 2012; 2: 331; DOI:10.1038/srep00331.
4. 岡本 研: 結晶構造からみた尿酸生成抑制剤の阻害機構. 日本医科大学医学会雑誌 2007; 3: 83-88.
5. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF: Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 10723-10728.
6. Truglio JJ, Theis K, Leimkuhler S, Rappa R, Rajagopalan KV, Kisker C: Structure 2002; 10: 115-125.
7. Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF, Nishino T: J Biol Chem 2003; 278: 1848-1855.
8. Venkatachalam CM, Jiang X, Oldfield T, Waldman M: J Mol Graph Model 2003; 21: 289-307.
9. Case DA et al.: AMBER. 2010; 11, University of California, San Francisco.
10. Frisch MJ et al.: Gaussian 09, Revision A.1. 2009; Gaussian, Connecticut.
11. Zhou HX, Gilson MK: Chem Rev 2009; 109: 4092-4107.とその参考文献.
12. Major DT et al.: Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 20734-20739.とその参考文献.
13. Kagawa H, Mori K: J Phys Chem B 1999; 103: 7346-7352.
14. Nakagawa Y, Kikuchi H, Takahashi H: Biophys J 2007; 92: 2570-2582.
15. Matsunaga Y, Fujisaki H, Furuta T, Moritsugu K, Terada T, Kidera A: PLoS comp biol. (in press); 藤崎弘士, 生体分子におけるパスサーチ・パスサンプリング, 日本医科大学基礎科学紀要, 2011; 40: 83-98.
16. Fujisaki H, Zhang Y, Straub JE: Adv Chem Phys 2011; 145: 1-33.

(受付: 2012 年 3 月 29 日)

(受理: 2012 年 4 月 27 日)